

First, to 300 ml of a JIS K3363 medium (NH_4Cl 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002%, yeast extract 0.03%, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%) containing 10 ppm of polyethylene glycol dodecyl ether (EOp=7, hereinafter, abbreviated as EO-7) which is one kind of polyoxyethylene-based nonionic surfactants as a carbon source, 20 ml of activated sludge were added and the whole was cultivated at 25°C while shaking. The concentration of EO-7 was increased in series of 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1,000 ppm, and an enrichment culture was attempted. As a result, after 25 days, the concentration reached to 1,000 ppm. The decomposition degree of EO-7 was measured by disappearance of bubbles, a cobalt isothiocyanate method (JIS K3364), and a gas chromatography analysis.

To a JIS agar medium containing 500 ppm of EO-7, a culture solution in which the decomposition was completed at 1,000 ppm of EO-7 was added and the whole was cultivated at 32°C for 24 hours, followed by collection of a single colony. After that, a plating method was repeated three times and a microorganism having an excellent decomposing ability was isolated. The microbe was acclimated to a concentration of 1,000 ppm of EO-7 again. The decomposition degree of EO-7 of the acclimated microbe was examined, and as a result, about 80% of EO-7 were decomposed through cultivation for 13 hours. The microbiological properties of the acclimated microbe (hereinafter, tentatively referred to as EO microbe) were

examined and the microbe was confirmed to belong to a novel microbial species.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 52-057389

(43)Date of publication of application : 11.05.1977

(51)Int.Cl.

C12K 1/00
// C12K 3/00
C12D 13/10

(21)Application number : 50-132423

(71)Applicant : LION CORP

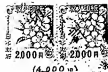
(22)Date of filing : 06.11.1975

(72)Inventor : NEGI TAHE
SUGIYAMA KEIKICHI

(54) METHOD OF DECOMPOSING NONIONIC SURFACTANTS

(57)Abstract:

PURPOSE: To convert waste water containing polyoxyethylene type nonionic surfactants into harmless form by using a specific species of *Pseudomonas* genus.



① 日本国特許庁

公開特許公報

昭和50年11月5日

特許庁長官 新藤 英雄 殿

1 発明の名称 非イオン界面活性剤の分解方法

2 発明者

住 所 千葉県千葉市小湊台4の3の18の405

氏 名 落 直 太 兵 衛 (ほか1名)

3 特許出願人

住 所 東京都豊田区豊町一丁目2番22号

名 称 クイオン脂樹保天化学社

代表者 小 林 宏

4 代理人 〒104

住 所 東京都中央区八重洲5丁目5番地

八重洲5の5ビル 電通東京(271)3020

氏 名 (7552) 井 理 士 後 藤 道 生

5 願付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通
- (2) 願 望 明 本 1 通
- (3) 発 注 状 1 通
- (4) 微生物培養委託申請書発注番号票 1 通

力 式 (1)

① 特開昭 52-57389

② 公開日 昭 52.(1977) 5.11

③ 特願昭 50-132423

④ 出願日 昭 50.(1975) 11.6

審査請求 未請求 (金5頁)

庁内整理番号

7235 49
7235 49
7248 49

⑤ 日本分限

362A53
362B3
362C0

⑥ Int.Cl1

C12K 1/00H
C12K 3/00
C12D 13/10

簡別
記号

明 細 書

1 発明の名称 非イオン界面活性剤の分解方法

2 特許願書の略図

レヌードモナス菌に属し非イオン界面活性剤分解能を有する微生物を培地に培養し、得られた菌体又は菌体の処理物をポリオキエチレン系非イオン界面活性剤と接触させることを特徴とするポリオキエチレン系非イオン界面活性剤を分解処理する方法。

3 発明の詳細な説明

本発明はポリオキエチレン系非イオン界面活性剤分解能を有し、レヌードモナス菌に属する微生物を培地に培養し、生育した微生物の菌体又は菌体を常法により処理した処理物をポリオキエチレン系非イオン界面活性剤に作用させ、これを分解処理する方法に関する。

従来より非イオン界面活性剤は陰イオン系界面活性剤とともに、家庭用洗剤として、また工業用洗剤として広く使用されている。特に

アルキルエーテル型、アルキルアリアルエーテル型、アルキルエステル型、ソルビタンモノエステル型等のポリオキエチレン系非イオン界面活性剤は、魚毒性、皮膚刺激性等の生物体に対する影響が小さく、かつ使用量は増大している。通常ポリオキエチレン系非イオン界面活性剤は、使用後排水として最終的に下水処理場等における設備により分解処理される。該排水の処理法としては活性汚泥法、生物安定化法、固定膜法等の生物処理法が広く採用されている。しかしながらこれら生物処理法は微生物の処理効率が低いため、長い処理時間および設備費の増加にともなう処理工程の増大、および設備規模の大型化を招き、これらによる。このことは、一般に知られた活性汚泥等の多量種の微生物培養系が充分な処理能力を有しないことによる。本発明者は、排水中のポリオキエチレン系非イオン界面活性剤を高濃度においても効率よく短時間で分解し、ひいては処理設備を減少し、その方法について鋭意研究

を呈ねた。

その結果、不発明者等にシユードモナス菌の新菌株に属する微生物の菌体内生細胞が顕著に非イオン界面活性剤分解能を有することを発見し本発明を完成した。

先づポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤の1種であるポリエチレングリコールデシルエーテル（EO-7 以下EO-7と略称する）を炭素源として10 ppm含有するJ18 K5563培地（ NH_4Cl 0.5%、 K_2HPO_4 0.1%、 KCl 0.025%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002%、イーストエキストラクト0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%）500 mlに、活性汚泥20 mlを添加し25℃で炭とう培養した。EO-7の濃度を10、50、100、200、400、600、800、1000 ppmと順次上昇させ無炭培養を試み、2.5日間で1000 ppmにまで達した。EO-7の分解度の測定は泡沫の消失、コバルトテオレアノート法（J18 K5564）、ガスクロマト分析によって行なつた。

肉形（4.4～4.5 cm/5日）、均質、薄く中央凸、表面平滑、無色、先次、中央少し赤、粘糊、辺縁平滑、不透明

斜面培地（肉汁基大培地）

発育中、厚く、表面平滑、無色、形状一様、辺縁平滑、粘糊

ゼンシ培養

発育の程度弱、表面の発育有、発育の狀態微状

液体培地（肉汁培地）

発育の程度微弱、沈凝無、ガス発生無、無臭、着色無、濁り一様、表面発育無、メチレンブルー色弱減化無

炭素源 炭素性

増殖速度 20～36℃ 最適36℃

増殖pH 5.0～9.0 最適7.5

色素産生 無

ゼラチン 減化せず

リトマス・ミルク培地 還元（アルカリ化、酸化性せず）

（ペプトン化、凝固せず）

特開 昭52- 57389(2)

EO-7 1000 ppmで分解が完了した培養液をEO-7 500 ppm含有J18基大培地に加へ32℃、24時間培養し、単一コロニーを取出し平皿分離を5回繰り返してEO-7分解力の増れた微生物を単離した。この菌を再度EO-7 1000 ppmの濃度まで馴化し、この馴化菌のEO-7の分解度を試したところ13時間の培養でEO-7の約80%を分解した。この馴化菌（以下EO菌と仮称する）の菌学的性質を模したところ新菌株に属することを確認した。本EO菌をパーシス マニユアル オブ デターミナティブ バクテリア オロイ第8版の方法並びに其他の文献を参考にしてその形態学的及び生理学的性質を模した結果は下記の如くである。

形態学的性質

形態 桿菌、0.7～0.8×1.4～2.8μ

鞭毛 単毛、運動性有（弱）

グラム染色性 陰性

菌体の粘 凝集

菌形培地表面発着（肉汁基大培地）

生理学的性質

硝酸還元 +（ N_2 発生）

硝酸呼吸 +（ N_2 発生）

グルコースの酸化分解 +（發酵せず）

オキシゲナーゼ +

カタラーゼ +（強）

アルギニンヒドロラーゼ +

インドール産生 -

硫化水素発生 -

尿素分解 -

カロチノイド産生 -

中性紅の還元 -

メチレンブルーの還元 -

デンプンの加水分解 -

VDF反応メチレンレッド試験 -

アンモニア生産 +（弱）

糖の分解（酸の生成）

グルコース +

キシロース -

ラクトース -

リュウグロース -

デンプン -

グリセリン -

唯一の炭素源としての利用性

グルコース + コハク酸 +

キシロース + (弱) クエン酸 +

ラクトース - グルコン酸 +

リュウグロース + プロトカチキ酸 +

デンプン - 炭素源 +

グリセリン + サルチル酸 -

アコース - F.H.B (P-ヒドロキシ炭基管線) +

トレハロース - ベタイン +

ノゾノリトル - F.A.B (P-アミノ炭基管線) +

チアラニン + -

レーアルギニン + ゲンチオン酸 + (弱)

リレーアルギニン + アントラニル酸 -

レーバリン +

アトレニン +

上記の如く本B0菌はグラム陰性の桿菌であり、呼吸的にグルコースを分解し

酸を生産する。オキレダーゼ、カタラーゼ活性などの点からリュウドモナス属の一種に属すると同定した。更に種の特異性を行いB0菌の菌株と見られるリュウドモナス属に属する8種の菌株を選び種々の生理学的性質につき比較検討した。この比較結果を下記に表示する。

B0菌とレードモナス属の菌株間の性状比較表

菌株	性質	炭素源	たんぱく質	41℃での生育	炭基管線	ペクチン分解	セルロース分解	炭化水素	カタラーゼ
B0 菌		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. aeruginosa</i>	d	d	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. putida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. syringae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. cichorii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. stutzeri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. mendocina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. alcaligenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ps. denitrificans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : 90%以上陽性

- : 90%以上陰性

d : 10%~90%の間で陽性

上記B0菌の菌株の性質並びに菌株間の比較表の示す如く、B0菌は硝化呼吸能を有し脱窒作用を示すこと、色素を生産しないこと、生育温度の範囲は36℃であることに特徴を有し、これらの性質のうち炭基色素を生産せず、脱窒作用を示す *Ps. stutzeri* は41℃でかなり生育すること、でんぷんを加水分解すること、リトマスミルク培地でアルカリ化すること、グルコースを分解しないことなどの点でB0菌と異っている。又 *Ps. mendocina* は41℃で生育すること、カタノイドを生産する点でB0菌と異り、*Ps. denitrificans* は炭化水素を発生すること、グルコースを分解しない点でB0菌と相違している。リュウドモナス属の菌株において生育温度の差は菌株を区別する重要な条件といえることができる。

以上の点でB0菌は従来記載されている菌株の性状と一致しないので、B0菌を新菌株に属する菌と同定し、*リュウドモナス nov. Sp. LF3101* (微生物研究雑誌3299)と仮称する。

本発明方法を実施するにあたっては、前記した通りJIS K5565培地で酸化したポリオキエチレン系非イオン界面活性剤分解能を増強に培養して、生育した菌体をポリオキエチレン系界面活性剤を含有する溶液に懸濁して反応させるか又は菌体を常法により乾燥し、例へば既述、超音波処理、凍結乾燥処理又はホモジナイザー処理その他の破碎細胞処理等を経て、分離又は分離せずにポリオキエチレン系界面活性剤に接触せればよい。界面活性剤の分解度はコバルトナオリアート活性の低下率をもつて示した。

向上記処理物を常法により精製して活性を高めた活性物質を採取し、各種酵素的特性を調べた。これら活性物質も本発明の分解処理方法に使用できることは勿論である。かくして本発明方法により効率的に非イオン界面活性剤を分解処理することができた。

以下実施例を示す。

実施例 1

80 箇を斜面培地から 10 ml トリプトソープロス中に移植し、18 時間 50℃ で前培養した。これを培養液としてポリエチレングリコールデシルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=8$) を炭素源として各 50、100、200、400、600 ppm 含有 J18 培地 200 ml 中に移植して馴化を行つた。600 ppm 培地での 80 箇によるこれら界面活性剤の分解度については、抜粋コバルトチオシアネート法性 100% のものがポリエチレングリコールデシルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=8$) の場合 12 時間で 25%、24 時間で 20%、1 週間で 20% に低下した。

実施例 2

ポリエチレングリコールデシルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=8$) を含有する J18 K3563 培地で馴化した 80 箇の生分を 1 週間培地より得た洗淨菌体を用いて、種々の非イオン界面活性剤の分解試験を行つた。

先づ 500 ppm の上記生分を 1 週間培地 900

ml を遠心分離して菌体を集め、生理的食塩水で 1 回洗浄したものを用いて菌体とした。培地 900 ml あたり菌体湿重量は約 1.6 g であつた。

供試非イオン界面活性剤は下記の通りである。

ポリオキシエチレングリコールノニルフェニルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=9$)

甘城アルコール ($\text{U}_{15}-\text{U}_{18}$) エトキレレート ($\text{EO} \overline{\text{P}}=8$) (商品名リボソックス ICM ライオン油脂 K.K. 製)

ポリエチレングリコールデシルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=8$)

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (商品名 Tween 80、東京化成 K.K. 製)

ポリエチレングリコール ($\text{MW}=400$, PEG 400) 約 1.6 g の菌体を 20 ml のトリスメタ酸液 (pH 2.5 $2.0 \times 10^{-2} \text{M}$) に懸濁させ、これに 20 ml の各種非イオン界面活性剤 (1000 ppm 水溶液) 20 ml を加へた。50℃ で攪とう (60 回、1 分) し、随時的に反試液を 4 ml 採取し遠心した上清のコバルトチオシアネート法性を測定して分解

度をしらべた。分解度は下表の通りである。

添 加	コバルトチオシアネート法性		
	0 hr	1 hr	4 hr
ポリオキシエチレングリコールノニルフェニルエーテル	100	66	53
I U H	100	80	70
ポリオキシエチレングリコールデシルエーテル	100	60	70
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート Tween 80	100	97	94
PEG 400	100	97	94

実施例 3

ポリエチレングリコールデシルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=7$) 600 ppm 含有 J18 培地 500 ml、24 時間培養した培養液 15 ml を 8000 rpm (10000 G) 10 分間遠心分離し上清と菌体とに分けた。上清を脱炭酸、凍結乾燥により 50 ml まで濃縮した。一方菌体は 0.85% 生理的食塩水で 2 回洗浄した後、5 mM トリス塩酸液に懸濁させ、超音波細胞破砕機 (大岳製作所製

150W 20KU) を用いて超音波処理を行つた。超音波処理液は 18000 rpm (3970 G) 50 分遠心分離し上清の酵素活性を調べた。結果は下表の通りである。

試 料	蛋白 (g/ml)	比活性 (u/mg 蛋白)
培養液上清	2.7	0.0
超音波処理上清	3.64	0.62

反応系：底質 ポリエチレングリコールデシルエーテル ($\text{EO} \overline{\text{P}}=7$) 2 mM、トリスメタ酸液 (pH 2.5) 50 mM 中 55℃ 攪とう条件 F で反応を行つた。

法 性：ガスクロマトグラフ (GLC) を用いて発酵質の減少度から表示し、1 ml の酵素液が 55℃、60 分で 1 μmol の底質分解能を持つと 1 単位とした。

上記の通り酵素は菌体に存在し、超音波処理で可溶化されることがわかつた。

特許出願人 ライオン油脂株式会社
代 理 人 後 藤 道 生

4 附記以外の説明者

任 所 千葉県市川市新田 1-9-5
氏 名 杉山 圭吉